

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-501174

(P2002-501174A)

(43) 公表日 平成14年1月15日 (2002.1.15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
G 0 1 N 33/543	5 2 1	G 0 1 N 33/543	5 2 1 4 B 0 2 4
C 0 7 K 17/00		C 0 7 K 17/00	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 37/00	1 0 2

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-527830(P2000-527830)
 (86) (22) 出願日 平成10年12月24日 (1998.12.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年6月30日 (2000.6.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/BE98/00206
 (87) 国際公開番号 WO99/35499
 (87) 国際公開日 平成11年7月15日 (1999.7.15)
 (31) 優先権主張番号 60/071,726
 (32) 優先日 平成9年12月30日 (1997.12.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

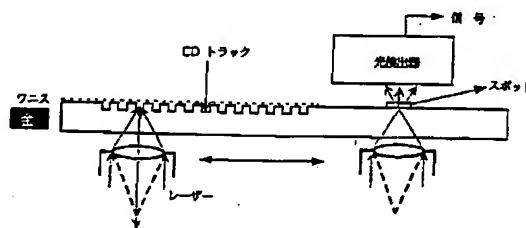
(71) 出願人 ルマクル, ジョゼ
 ベルギー, ベー5020 マロンヌ, シュ
 マンド ピエール 14
 (72) 発明者 ルマクル, ジョゼ
 ベルギー, ベー5020 マロンヌ, シュ
 マンド ピエール 14
 (74) 代理人 弁理士 安達 光雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ディスク表面上に固定された捕獲分子を含む方法

(57) 【要約】

本発明は記録データを含むディスク表面上に固定された開裂不能捕獲分子と標的分子の結合によって標的分子を検出及び/又は定量する方法に関する。本発明は表面に開裂不能捕獲分子を固定されたディスク、その製造方法、及び前記ディスクの又は前記ディスクを含む診断及び/又は読取り装置にも関する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下のステップを含む、サンプル、好ましくは生物学的サンプル中に存在する標的分子の検出及び／又は定量方法：

- － 記録データを含むディスクである固体支持体の表面上に固定された捕獲分子と前記標的分子の間の結合を行わせ、前記結合によって信号を生ぜしめ、
- － 前記信号が捕獲分子の開裂を通して得られないという条件で前記信号を検出及び／又は定量する。

【請求項2】 捕獲分子及び標的分子がヌクレオチド配列であることを特徴とする請求項1の方法。

【請求項3】 捕獲分子及び標的分子がそれぞれ抗原又は抗体であることを特徴とする請求項1の方法。

【請求項4】 捕獲分子及び標的分子がそれぞれレセプター又は前記レセプターのリガンドであることを特徴とする請求項1の方法。

【請求項5】 信号の検出及び／又は定量が光線、好ましくはレーザー光線の反射、吸収又は回折、又は電磁場の変化によって得られることを特徴とする請求項1－4のいずれか一項の方法。

【請求項6】 信号の検出及び／又は定量が光線による結合した標的分子及び捕獲分子の励起後の蛍光放出によって得られることを特徴とする請求項1－5のいずれか一項の方法。

【請求項7】 信号の検出及び／又は定量が標的分子とその捕獲分子の間の結合の結果である光線、放射線又は磁場の直接放出によって得られることを特徴とする請求項1－4のいずれか一項の方法。

【請求項8】 光線の放出が化学的、生物学的、蛍光的及び／又は電気的ルミネセンス光又は放射線を放射する能力を持つ分子からなる群から選択される結合分子によって生成されることを特徴とする請求項6又は7の方法。

【請求項9】 標的分子と捕獲分子の間の結合が沈殿、好ましくはコロイド金属試薬の付着物の如き不透明の又は磁性沈殿、好ましくは銀沈殿をディスクの表面上に生成させ、及び／又はディスクの表面の一以上の層の腐蝕を生じさせることを特徴とする請求項1－8のいずれか一項の方法。

【請求項10】 標的分子と開裂不能捕獲分子の間の結合が前記結合から生ずる信号の検出及び／又は定量において用いられる一以上の分子の固定を可能にすることを特徴とする請求項1-9のいずれか一項の方法。

【請求項11】 前記他の分子がマイクロビーズ又は磁性粒子であることを特徴とする請求項10の方法。

【請求項12】 ディスクがその軸(A)上で回転している時に信号が得られることを特徴とする請求項1-11のいずれか一項の方法。

【請求項13】 ディスクの記録データが2進データ、好ましくは溝付2進データであることを特徴とする請求項1-12のいずれか一項の方法。

【請求項14】 ディスクがコンパクトディスクであることを特徴とする請求項1-13のいずれか一項の方法。

【請求項15】 記録データが捕獲分子と標的分子の間の結合から生ずる信号の処理及び解釈を可能にすることを特徴とする請求項1-14のいずれか一項の方法。

【請求項16】 ディスクが連結されて流体接触している微小流路を含むことを特徴とする請求項1-15のいずれか一項の方法。

【請求項17】 記録データを含むディスクにおいて、ディスクがその表面上に固定された開裂不能捕獲分子であって検出及び／又は定量されるべき標的分子と結合する捕獲分子をさらに含むことを特徴とするディスク。

【請求項18】 開裂不能捕獲分子及び／又は標的分子が核酸分子、好ましくはヌクレオチド配列、抗原、抗体、レセプター、レセプターのリガンド、ペプチド性又はタンパク質性分子、脂質、糖、ハプテン、発蛍光団、発色団、触媒、組合せ化学によって得られる新規巨大分子、又はそれらの組合せからなる群から選択されることを特徴とする請求項17のディスク。

【請求項19】 ディスクの記録データが2進データ、好ましくは溝付2進データであることを特徴とする請求項17又は18のディスク。

【請求項20】 コンパクトディスクであることを特徴とする請求項19のディスク。

【請求項21】 連結されて流体接触している微小流路を含むことを特徴と

する請求項 17-20 のいずれか一項のディスク。

【請求項 22】 請求項 17-21 のいずれか一項のディスクの製造方法であって、開裂不能捕獲分子の光活性化を通して、前記捕獲分子を予めデータが記録されているディスクの表面上に固定するステップを含む方法。

【請求項 23】 開裂不能捕獲分子が捕獲分子の端とディスクの表面層の間の共有結合を通して得られることを特徴とする請求項 22 の方法。

【請求項 24】 ディスク表面が保護層、好ましくは有機化合物製の保護層によって回復され、前記保護層が開裂不能捕獲分子の保護及び安定化及び／又は標的分子とその開裂不能捕獲分子の間の結合の保護、安定化及び／又は検出を可能にするか又は改善することを特徴とする請求項 22 又は 23 の方法。

【請求項 25】 請求項 17-21 のいずれか一項のディスク、及び標的分子とその捕獲分子の間の結合を行わせる反応体、及び所望により前記結合から生ずる信号を検出する反応体を含む診断キット。

【請求項 26】 サンプル中に存在する標的分子とその捕獲分子の間の結合から生ずる信号を検出及び／又は定量する検出及び／又は読取り装置であって、請求項 17-21 のいずれか一項のディスク又は請求項 25 のキット、及び前記信号の検出及び／又は定量のための手段を含む装置。

【請求項 27】 読取りコンパクトディスク装置である請求項 26 の検出及び／又は読取り装置。

【請求項 28】 ディスク上の記録データを読取るための第一読取りヘッド、及び標的分子とその捕獲分子の間の結合から生ずる信号の検出及び／又は定量のための第二読取りヘッドを含むことを特徴とする請求項 27 の検出及び／又は読取り装置。

【請求項 29】 一体化された検出及び／又は読取り装置内での標的分子の精製、標的分子の特異的開裂、前記標的分子の所望の遺伝子増幅のための付加的な手段を含む請求項 26-28 のいずれか一項の検出及び／又は読取り装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の属する分野

本発明はディスクの表面上に固定された捕獲分子と標的分子との結合によって標的分子を検出及び／又は定量する方法に関する。

【0002】

本発明は開裂不能捕獲分子を表面上に固定されたディスク、その製造方法、及び前記ディスクの又は前記ディスクを含む診断及び／又は読取り装置にも関する。

【0003】

発明の背景

(微生物から得られるヌクレオチド配列のような) 標的分子の完全な検出方法は以下のステップを必要とする：

- － 所望によりサンプルを調製し、
- － 所望により「精製された」分子を増幅し、
- － 前記分子を「捕獲」分子（即ち、配列又はレセプター）、好ましくは固体支持体上に固定された「捕獲」分子上に結合させ、
- － それをラベリングし、そして最後に
- － 前記ラベリングから得られた信号を分析する。

【0004】

従って、これらのステップのうちのいくつか（又は好ましくは全て）、特に得られた信号の分析を行うことができ、多数の複雑な分子の中から検出されるべき特異的な分子又は微生物を識別することができる所望により単純化された自動装置及び方法に対する要求が存在する。

【0005】

決められた小表面上に結合する分子の小型化及びそれらの位置の同定のための探索はDNAチップとして設計されたネットワークの構築のための微小電子回路の利用に導いた（米国特許5632957、米国特許5605662及びWO 94/22889）。

【0006】

多数の生物学的分子を分析するための他のアプローチはバイオチップである。これらの生物学的分子はバイオチップの表面上での捕獲分子の直接合成によって (WO 97/29212)、又は合成又は単離後のこれらの捕獲分子の固定 (WO 98/28444) によって形成させることができる。前記技術の欠点の一つは極めて低い信号を読取るために複雑で高価な装置を使用することである。加えて、定量的アッセイを行う必要がある場合、この装置はスポットの位置の同定及び前記信号の一体化のための特殊なソフトウェアを含まなくてはならない。

【0007】

電子装置はチップを自己アドレス可能な装置を作るために特異的微小位置へ捕獲されたオリゴヌクレオチド又は抗体の如き特異的結合成分を輸送して付着させることを制御することができる。分子を固定するためには、一つの微小電極が正に帯電されてオリゴヌクレオチドをその表面に吸引する。DNAや抗原の如き標的分子と結合した後、検出は標的分子が結合している微小電極を位置決定するためのエピ蛍光型顕微鏡検出システムを用いて行われる。

【0008】

前記技術は微小回路を生ずるこの基体上のネットワークを形成するために基体に付着されたDNA結合タンパク質に適合されている (米国特許5561071)。

【0009】

しかし、装置の微小電極の各々上に捕獲分子を一つずつ固定しなくてはならないという事実のため、使用することができる捕獲分子の数には限界がある。他の限界は放出された信号の分散による、隣接電極から来る信号間の識別において得られる解像度である。最後に、放出信号は処理される前に分析及び解釈される必要がある。

【0010】

従って、特異的な標的分子、標的微生物又はその一部分の同定及び／又は定量を可能とするために固体支持体上に与えられる「捕獲分子」の数を増大させる必要がある。しかし、古典的な検出支持体及び手段はかかる適用のためには容易に

適合されることができない。というのも、それらはそれらが含有し得る「捕獲分子」の数、信号間の識別、アッセイの特異性又は再現性によって制限されるからである（米国特許5567294参照）。更に、読取り機械は複雑で高価すぎる。

【0011】

文献WO 98/01533は基体付着端（これはコンパクトディスクであることができる）を有する開裂可能なスペーサー、信号反応端（これは金属ビーズ、特に金ビーズに結合することができる）、及び選択された分析対象物上の第一位置に結合するように適合された第一側部分及び前記選択された分析対象物の第二位置に結合するように適合された第二側部分を含む開裂可能な信号素子を記述している。分析対象物が第一側部分及び第二側部分上に固定される場合に信号が測定される。固定後、スペーサーが開裂されるので、分析対象物の固定が陽性信号の検出を可能にする。

【0012】

しかし、この複雑で高価な検出方法及び装置は前記開裂可能な信号素子と様々な相互作用を生じ得るので、様々な複合体分析対象物の検出において様々な偽陽性又は偽陰性を生ずる。

【0013】

発明の概要

本発明は特許請求の範囲において記述されるような標的分子の検出及び／又は定量方法に関する。

【0014】

本発明は特許請求の範囲において記述されるような開裂不能捕獲分子を表面上に固定されたディスクにも関する。前記ディスクは本発明による検出及び／又は定量方法において用いることができる。

【0015】

本発明の他の側面は前記ディスクの製造方法、前記ディスクを含む診断キット、前記ディスクを含む診断及び読取り装置又は本発明によるディスクの上に存在するデータの読取り及び分析を可能にする診断及び読取り装置に関する。

【0016】

「ディスク (disc)」の技術的特徴

「ディスク」という用語は平坦な固体支持体（通常、円板の形状をしている）であって穴を含み（その穴はその穴の中心に位置する軸（A）に従った前記支持体の回転を可能とする）、通常一以上のポリマー層及びポリマー層を被覆することができる一以上の金属層（金やアルミニウムの薄層のような）を含む硬質材料で作られており、光線、好ましくはレーザー光線（これらは前記ディスク上の予め記録されたデータの検出及び読取りのために用いられる）を透過及び反射するものを意味する（図1参照）。

【0017】

前記ポリマー層及び金属層の配置はレーザー光線の透過及び反射が選択された層上でのみ可能となるように調節される。例えば、ディスクはレーザー光線を透過する上位層を含んでもよく、透過したレーザー光線は第二の下位金属層だけによって反射されるであろう。

【0018】

「ディスク」の定義は（レーザー光線の透過及び反射によって）CD読取り装置によって読取ることができるデータを含むCD又は「DVD」の如きいかなる固体支持体をも含む。

【0019】

「CD読取り装置によって読取ることができるデータ」とは所望の記録データ（即ち、前記固体支持体の特異的領域上の捕獲分子の特性についての）、又は標的分子と捕獲分子の間の結合の結果である信号の処理に用いられるデータを意味する。

【0020】

コンパクトディスクの如きディスクの一以上の区分は標準的な読み書きデジタル技術によるデータ処理に供される（CDトラック；図3～5及び7を参照）。処理及び分析のための特別のデータはデジタル記録手段を用いてコンパクトディスク表面上に記録される。好ましい実施態様に加えて、ディスク上の読出し専用記憶素子（ROM）は、ディスクを操作して捕獲分子と標的分子の間の結合

位置と結果を記録する使用者によってアクセス可能であるコンパクトディスク情報、説明、実験プロトコール、データ分析及び統計方法を含む。

【0021】

加えて、ディスクはディスク機能の調整のためのマイクロプロセッサを含む電子回路部品、及びディスク操作及び／又は読取り装置又は他の装置との通信のための装置を含むこともできる。ディスクは最適には以下のものを含む：検出器及びセンサー、又はこれらの装置の部品及び様々な検出方法のためのエネルギー源（電気化学システムのための電力供給、分光分析システムのための電磁放射源）、又は前記検出器及びセンサーを用いたデータ生成及び操作を容易にする光学的に透明な材料の如き材料、作動器、電磁的（レーザー、赤外線、高周波、マイクロウェーブ）、電気的、又は他の手段を用いてディスクと作動／読取り装置の間の通信を媒介する通信及びデータ取扱い装置；診断システム、アッセイプロトコール及びアッセイデータの分析を含むディスク上での手順及び処理を制御するために設計された回路部品。これらは製造時点のみでプログラムされるASICs又はROM；FGPAのEPROM、フラッシュ・メモリ（UV消去可能EPROM）、又はプログラム可能なIC配列、又はプラットフォーム操作装置又は他の装置を通して使用者によってプログラムされることができると同様の配列の形で与えられる。本発明の部品にはCPU及びマイクロプロセッサユニット及びアセンブラ言語又はディスク通信を通してプログラム可能な高レベル言語を用いて操作する関連RAM、及び遠隔ディスプレイ又はデータ分析システムとのファクシミリ／モデム通信を含む、他の装置との通信を媒介するための部品をも含む。

【0022】

本発明によるディスクの一つの注目すべき側面はディスク材料内に埋め込まれた所望により予め記録されたデータパターンの微視的配列の密度である。それは反射性ディスクの表面におけるくぼみを検出するためのレーザー光線を用いた光学的記憶である。このように高度にデータを圧縮して正確に読み戻す能力は本発明によるディスクにその規定する特徴の一つ、つまり莫大な量のデータを記憶する能力（音声データのコンパクトディスクについては記憶の量は約650MBの

データである)を与える。

【0023】

本発明によるディスクは様々なポリマー又は金属層上で様々なレーザー光線を透過及び反射するために適合されることができる。

【0024】

例えば、レーザー光線の放出及び反射されたレーザー光線の検出のために用いられるレーザー装置はディスクと測光器の間に配置されるホログラムを有利には含んでいてもよい。

【0025】

ディスクは1.2mmの厚さと4.72インチの直径を一般的に持つが、より小さい支持体も存在し、特殊な適用（ペトリ皿への捕獲分子と標的分子の間の結合の如き）のために適合されることができ、厚さは用いられる本発明の検出方法と捕獲分子の技術的要求に応じて適合されることができる。

【0026】

ディスクはレーザー光線によって検出を行うための溝を組入れることができる。前記溝中には「記録された」データが組入れられ、このデータは後で分析されて有利にはデジタルデータに転記される。好ましくは前記記録されたデータは2進情報の形である。好ましくはこれらの溝は固定された開裂不能な捕獲分子を含む。

【0027】

レーザーはその強力で狭く焦点を合わされた光線を通して、高速で回転しているディスク表面上の何千もの小さなくぼみの通過を正確に検出及び記録するための手段を提供する。前記検出方法は摩擦を全く生じない。というのも前記検出は反射光における位相シフトの測定に基づいているからである。この技術はかなりのデータ圧縮を検出することを可能にする。というのも、注意深く焦点を合わされたレーザー光線はディスク表面における極めて小さい変異に光速で応答することができるからである。

【0028】

通常天然又は人工光源から由来する光は、たとえ同一周波数の光線から由来す

る場合であっても無作為波パターンで動く光子からなる。この種類の光線は非干渉性とみなされる。つまり、波があらゆる方向に移動するということである。これに対し、レーザーに関連する光は有利なことに、干渉性であるとみなされる。

【0029】

レーザー光線はエネルギー源がいわゆる活性媒体 (active medium) 中へ導入されることによって生成される。活性媒体の各側に配置された一対の鏡はそれに衝突する放射線の一部分を透過させるために用いられる。活性媒体は気体状混合物 (ヘリウムやネオンの如き) 又は結晶質マトリックス内のイオン (コンパクトディスク (CD) のドライブ及び記録装置において通常用いられるヒ化ガリウムレーザーにおいて見出される如き) からなることができる。光を刺激するのに用いられるエネルギー源と材料が生ずる光線の強度と光度を決定する。CD装置内で用いられるレーザーは通常、極めて低出力のものである。

【0030】

CD駆動レーザーは回転しているディスクに指向され、反射光はレンズを通過して光ダイオードに衝突する (図3-5を参照)。ディスク表面上のデータはビット (ディスク中のくぼみ) 及びランド (ディスクの表面) 又はディスクトラックの形でコードされている。

【0031】

光ダイオードに結合された論理測時回路は (光がディスク表面に衝突する場合に) 光が走行した距離と (光がディスク表面中のくぼみに衝突する場合に) 光が走行した距離の間の差異を記録することができる。この差異は光線中の位相シフトとして検出される。

【0032】

すべてのデジタルコードされた情報と同様に、連続したビットとランドからなるパターン—これは光ダイオードによって1と0の電子ストリングとして中継される—は大幅に複雑なアナログ等価物 (例えば現在の事例では標的分子とその捕獲分子の間の結合レベル) を表すことができる。本発明によるディスクの表面上に存在するビットとして示されるこの情報は「捕獲」分子と「標的」分子の間

の結合の結果である。

【0033】

表面上に捕獲分子を固定された本発明によるディスクは保護層を含んでもよい。この保護層は「捕獲」分子の保護及び安定化を可能にするか又は改良する有機化合物から所望によってなり、例えばアルブミン、二糖類（トレハロース等のような）のタンパク質性化合物及び／又は糖化合物からなる。

【0034】

前記層の組成は用いられる捕獲分子の特異性に依じて当業者によって適合される。もし必要ならば、前記組成はレーザー光線が前記層を困難なく読取ることができるように、そして「標的」分子とその「捕獲」分子の間の結合又は前記結合の結果を検出することができるようにするために適合されることができる。もし必要ならば、前記層は捕獲分子と標的分子の間の結合が行われる前又は後に省かれてもよい。

【0035】

ディスク中の一連のピットによる通信を成功させるためにはコンピューター処理及びいくつかの既に利用可能な高度技術が必要とされる。レーザーの読取り機構はディスク表面にはいかなる点においても接触しない；すべてのデータはレーザーの反射によって好ましくは伝えられる。通常の音声CDにおいてはレーザー光線がランドによって反射されて戻ってくるのにはある程度の時間がかかるが、入り込んでピットによって反射される場合はより長い時間がかかる。ピットの深さはレーザー光の波長の $1/4$ となるように設計される。ピットからの反射光線がランドからの光線と相殺するならば、信号通過が得られる。（ピットの始まり又は端によって信号を送られた）信号通過は2進数1を表す。もし信号通過がなければ、これは2進数0を示す。

【0036】

商業的なCDドライブの一つの特異的な特徴はかかるピットを読取って900 Kb/秒で送出するそれらの特性である。このことはこのレーザー反射器技術を記録されたピットの読出しのみならず結合の結果の読出しのためにも特に好適なものにする。

【0037】

データパターンを読取る間同調を維持するため、CDドライブはRun Length Limitedと呼ばれるハードディスクドライブに通常見出される自己測時機構を用いる。データはらせん形トラック上の制限された部分内に存在するので、各データ部分は約300ナノメートル広がり、CDマイクロ制御器はディスクの回転速度と通過の出現に同調することによって規則正しい測時信号を作り出すことができる。多くの形のデータ記憶はデータバイトを記憶するために8ビット配列を用いるが、通常のCDは1と0の組合せの生成を回避して記憶されたデータの解読を防止するために14ビットのパターンを必要とする。この改変された形の記憶はEFM (Eight-to-Fourteen Modulation) と呼ばれる。縁取りビットと呼ばれる付加的な3ビットは14ビット部分の間のセパレーターとして作用し、単一8ビットバイトのデータを表す17ビットパターンを生ずる。

【0038】

ビットレベルでのデータの他の重要な部分は588ビットからなる枠 (frame) である。枠はビットの集合を包含する：それらのうちのいくつかはデータを意味し、他のものはレーザがディスクの回転と同調することを可能にし、更に他のものはCD装置内のエラー訂正能力に寄与する。ビットのこの集合のうち、24の17ビットユニット (全部で408ビット) のみが8ビットバイトへと翻訳されることができる。多くの付加的なビットは含まれる情報を単なる2ダースのデータバイトに伝えるのに必要である。

【0039】

本発明によるディスクはいかなる「外部 (external)」形状であることができる。上述の通り、前記ディスクの形状は円形又は楕円形であることが好ましいが、その外部形状は中心軸 (A) に沿った前記ディスクの回転を可能にする例えば六角形、八角形、四角形又は三角形であることができる。

【0040】

本発明によるディスクはCD-ROM XA、CD-DVD、音声CD、CD-ROM、CD-I、記録可能CD及び写真又はビデオCD (CD-ROM及びCD-Iブリッジ) 等の標準規格に対応することができる。前記CD標準規格は

データ記憶の種類、精度及び情報量に応じて異なることができる。

【0041】

本発明によるディスクの特別な領域は標的分子と捕獲分子の間の結合の結果である反応を読取るために用いられる。これらの特別な領域は本発明によるディスク表面の一部又はディスク上のある領域であり、その上に第二材料が固定されており、その表面が捕獲分子を含む。これらの領域はディスク中の空洞であることができる。前記第二材料はプラスチックのストリップであり、この上で標的分子と捕獲分子の間の結合が既に行われており、その後でその特異的読取りのためにディスク上に固定される。

【0042】

有利には各ストリップは分析されるべき同一サンプル又は異なるサンプルと特異的に反応するいくつかの異なる捕獲分子を担持していてもよい。その後、信号は同一ディスク上で個別に又は同時に読取られることができる。コンパクトディスクの如き古典的なディスクはかかるストリップを20以上も取扱うことができる。

【0043】

本発明のコンパクトディスクの製造及び操作のために最も有利な好ましい実施態様は以下の四つの既に存在する様式のうちの二以上の範囲内の寸法を有する：

- 約3.8 cmの半径と約1 mmの厚さを有する3インチコンパクトディスク (CD)、
- 約6 cmの半径と1 mmの厚さを有する5インチCD、
- 10 cmの半径と2 mmの厚さを有する8インチCDV (商業的には「レーザービジョン (Laservision)」ディスクと称される)、及び
- 15 cmの半径と2 mmの厚さを有する12インチCDVディスク。

【0044】

磁気テープに記憶されたデータの寿命は約6—12年である。記録可能なコンパクトディスクの寿命は一世紀は安定してデータを記憶できると一般的に推定されている。

【0045】

本発明による特殊なディスクの寿命はそれよりは短く、金属の腐蝕と固体表面上に固定された捕獲分子の起こり得る変性によって通常制限される。CDに記憶されるデータはハードディスクドライブ業界でおなじみの同心円（トラックと称される）で存在してもよいし、又は過去のレコードの如き連続らせんで存在してもよい。

【0046】

コンパクトディスクとそこにコードされた情報の一つの特徴的な特性はトラッキングシステムである。ディスクを半径方向に横切るCDレコーダーでの全光学ピックアップの動きを制御するために、及びCD上に存在する20000にも達する異なる半径トラックのいずれか一つを探索するために様々なシステムが商業的に利用可能なCDレコーダーには存在する。前記技術は標的分子と捕獲分子の間の結合の結果である信号を読取るために有利に適合させることができる。信号の読取りと予め記録された情報の読取りは同じ装置によって又は二つの異なる読取り装置によって行うことができ、それらは同じレーザー光線読取り装置又は二つのレーザー光線読取り装置であることができる。

【0047】

半径方向のトラッキングの訂正（光線による捕獲分子上の結合の同定）は刊行物“The CD-ROM Handbook, 第2版（Chris Sherman 編、Intertext Publication, McGraw-Hill Inc.）”において記述されているシステムのような特殊なシステムを用いて行われる。CDドライブはレーザーの読取りヘッドを位置させるための特殊な装置サーボ機構をも用いる。

【0048】

好ましくはディスクは例えばプラスチック、シリカ、石英、金属又はセラミック製の微小二次加工された機械的及び／又は光学的制御部品をプラットフォーム上に、及び／又は文献WO 97/21090に記載のような微小流路を組込んでいる。本発明の目的のためには、用語「微小加工された（microfabricated）」はサブミリメートル規模でこれらの構造の製造を可能にする処理に関する。これらの処理はフォトリソグラフィ、エッチング、スタンピング及び当業者には周知の他のナノ又はマイクロ技術手段を含むが、これらに限定されるものではない。

い。

【0049】

CD固体支持体の付加的な説明は以下の刊行物中に与えられている：The CD-ROM Handbook, 第2版 (Chris Sherman 編, Intertext Publication, McGraw-Hill Inc.), The Complete Recordable CD Guide (Lee Purcell & David Martin, Sybex 編), Digital Audio and Compact-disc Technology, 第2版 (Luc Bart, Luc Theunissen and Guido Vergult, Sony Service Center Europe, Ed. BH Nwines)。

【0050】

「標的」分子及び「捕獲」分子

「標的」分子及び「捕獲」分子は相互の間の結合（又は特異的固定）を作り出すことができるいかなる種類の生物学的及び化学的化合物であることができる。前記結合又は前記結合の結果は読取り装置によって、好ましくは光線（好ましくはレーザー光線）を用いて検出することができる。

【0051】

好ましくは前記「標的」分子は血液、尿、脳脊髄液、血漿、だ液、精液、羊水、空気、水、土壌又は粉碎された生物学的物質からなる群から選択されるサンプル中に存在する。

【0052】

好ましくは前記「標的」分子及び開裂不能「捕獲」分子は核酸、抗体、糖類、脂質、ペプチド、タンパク質、レクチン、触媒、レセプター、レセプターのアゴニスト又はアンタゴニスト、発蛍光団、発色団、キレート、ハプテン、イオン、異なるキラル構造を持つ分子、組合せ化学によって得られた新規の合成化学巨大分子、又は他の機能化巨大構造、部分又はこれらの組合せからなる群から選択される合成又は天然分子である。

【0053】

「開裂不能捕獲分子 (non-cleavable capture molecule)」は文献WO 98/01533に記載のような開裂可能なスペーサーを含まずかつ必要としない分子を意味し、これによって標的分子（又は分析対象物）と捕獲分子の間の結合の

検出が可能となる。本発明によれば標的分子と捕獲分子の間の単純な結合は以前には存在していなかった信号であって捕獲分子のいかなる特異的開裂をも必要とせず光線、好ましくはレーザー光線を用いた読取り装置によって直接的又は間接的に検出することができる信号を生成することを可能とする。

【0054】

本発明による標的分子又は開裂不能捕獲分子は標的分子の病原性の、治療上の、毒性の及び／又は他の改良された特性の特徴的挙動を監視又は研究するために検出及び／又は定量することが有利である。

【0055】

抗原／抗体結合は抗原又は抗体の検出を可能とするものであり、RIA及びELISA検出方法に基づいた診断テストにおいて用いられる。リガンド／レセプターは新規分子（レセプターのアゴニスト、アンタゴニスト、又は逆アゴニスト）のスクリーニングのための薬学研究において主に開発されてきた。核酸配列の検出は多数の遺伝子配列についての知識の増大及び増幅、ハイブリダイゼーション、分離及び精製技術の発達を通して高度に発展してきた（例えば J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, Molecular cloning: laboratory manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 参照）。

【0056】

ヌクレオチド配列の最初の一般的な検出及び増幅方法はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（米国特許4683195及び4683202）又はリガーゼ連鎖反応（LCR）（Wu and Wallace, 1989, Genomics 4:560-569）、転写に基づいた増幅システム（Kwoh等, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173-1177）又は循環プローブ結合（CPR）（Duck等, 1990, Biotechniques 9:142-147）及び米国特許5011769）の如き他の増幅のステップを含む。

【0057】

前記検出及び／又は定量的信号によるヌクレオチド配列の検出、定量及び記録は捕獲プローブ上へのヌクレオチド配列のハイブリダイゼーション（単一又はサンドイッチハイブリダイゼーションによる）及び配列の一つのラベリング後に得

られる。それによって検出信号が生じ、その変化が本発明による読取り装置によって記録されることができる。

【0058】

DNA配列に対しては多くの検出方法が適用されてきている(260nmでのそれら自身の吸光度によって又はエチジウムブロマイドの存在下でのそれらの蛍光によって検出される)。 ^{32}P の如きヌクレオチド配列へ組入れられた放射能活性のある標識の使用は高感度の検出を可能にするが、改良された安全性の制約規制のために日常的なアッセイのためには勧められない。

【0059】

加えて、ヌクレオチド配列は分子(例えば直接検出することができるフルオレセイン、ローダミン、ルテニウム又はランタナイドキレート)によってラベルすることができるし、又は酵素コンジュゲートに結合するような方法でラベルすることもできる。ラベリングはビオチン又はハプテン及びストレプトアビジンにコンジュゲートされた酵素又は対応する抗体を使用することによって得られる。有利には結合の生成物に応じて異なる信号を得ることができる。例えばペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼはTMB(テトラメチルベンジジン)又は5プロモ-4クロロ-3-インドールイル-ホスフェートを基質として用いると着色生成物を与える。光放出はルミノール又はAMPPD(3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3'-ホスホリルオキシ)1,2ジオキシエタン)を基質として用いることによって得ることができる。

【0060】

DAB(ジアミノベンジジン)はペルオキシダーゼが触媒する結合による酸化後、不溶性生成物に変換することができる。ピルビン酸キナーゼもATPを生成させるために用いることができ、このATPはルシフェラーゼによって変換されて検出光が得られる(生物発光検出方法)。

【0061】

有利にはプラスモン表面共鳴又は光学波案内の如き新規技術をラベルされていない標的分子の結合を検出するため、及び結合の動力学を追跡するために用いることができる(Gotoh等, 1995, DNA Res. 2: 285-293, Stimpson等, 1995, Proc

. Natl. Acad. Sci. USA : 92, 6379-6383)。

【0062】

コンパクトディスクの表面上への開裂不能捕獲分子の固定

開裂不能捕獲分子は光線検出装置又は他の装置による特異的な開裂不能捕獲分子とその標的分子の間に作られた各結合の間の特異的識別を可能にするためにCD上に特異的な間隔をおいて固定されることが好ましい。特異的な検出のためには、捕獲分子は溝や予め記録された情報を含まないディスクの特異的な領域に配置されることが好ましい。これによって予め記録された情報上の信号の結果であり得る偽陽性が回避される。

【0063】

コンパクトディスクの外部表面上の開裂不能「捕獲」分子の位置はインキュベーションのマイクロロソグラフィー及び／又は微小機械加工技術を用いる従来の物理的方法によって位置決めすることができる。これらの方法によって開裂不能捕獲分子は特定位置で保持され、そこに固定されるであろう。代替法は光活性化可能な化学基を使用することによって得られる。これは特異的な処理をされた位置（例えば光線（例えば焦点合わせされたレーザー光線）によって処理された、又は選択的イオンビーム又は選択的プラズマ処理によって処理された前記外部表面の一部分）に開裂不能捕獲分子を固定することを可能にする（文献WO 96/15223参照）。

【0064】

有利には本発明によるコンパクトディスクの外部表面はディスクをレーザーに基づくCD読取り器で読取ることを可能にするためのデータ（ディスクの溝中に配置された一連のビットとして通常記憶される情報であって、開裂不能捕獲分子をディスク表面上に配置するのに必要な情報）をも含む。これはディスクの溝中に好適なビット又はビットと等価の突出するくぼみを存在させることによって得られる。表面上への開裂不能捕獲分子の位置決め（固定）は全装置の一部であるレーザー光線と前記データを用いて最も良く得られ、そしてもし可能ならば同一のレーザー光線源がCD情報を読取るために用いられる。

【0065】

ディスク上への開裂不能捕獲分子の固定は共有結合又は非共有結合に基づく従来方法を用いて得られる。好ましい実施態様は分子端の一つにおける共有結合による固定であり、これは安定な固定と標的分子に結合するための表面における開裂不能捕獲分子の均一な存在を可能にする。

【0066】

光活性化可能な化学基の例はアジドニトロフェニルである。これは例えばスルホスクシンイミジル6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート (Pierce, Rockford, IL, USA) の如きヘテロ二官能性試薬を用いることによって自由アミノ基を担持するいかなる分子の端においても固定することができる。かかる光活性化可能な基はレーザー光線の如き照射位置でのみ反応し (Dontha, N. 等, 1997, Anal. Chem. 69: 2619-2625)、このようにして特異的プローブの固定はディスク上に良好に位置決めすることができる。化学的固定の他の例はカルボジイミドによるアミン上での核酸の5'-リン酸末端基固定、又はポリピロールポリマー中への閉じ込めである。ポリマーの表面は有機化学においては周知の結合を通して大部分の生物学的分子の固定を可能にするためにカルボキシ化及びアミノ化することができる (Zammatteo等, 1996, Anal. Biochem. 236: 85-94)。

【0067】

捕獲プローブを物理的に位置決めする一つの特別な方法はディスクの回転から生ずる求心力を利用することである。液体は入口ピットを通してディスクへ注入され、次に結合室に到達するまで微小流路を通して護送される (国際特許出願WO 97/21090参照)。

【0068】

開裂不能「捕獲」分子と「標的」分子の間の結合

開裂不能捕獲分子上への標的分子の結合 (又は固定) は標準的で再現可能な条件下で得られる。これらはヌクレオチドハイブリダイゼーション (好ましくは Sambrook等, Molecular Cloningの§ 9.31-9.58: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)に記載されているような標準の厳格条件下でのハイブリダイゼーション) として、抗原／

抗体結合として、レセプター／リガンド結合又はタンパク質／ヌクレオチド又は化学的／化学的分子認識の如き他の分子相互作用として現在では周知である。

【0069】

好ましくは前記分子は前記結合を可能にするため、官能基性化学基（第一アミン、スルフィドリル、アルデヒド等）、共通配列（核酸）、エピトープ（抗体）、ハプテン又はリガンド基を（初めから又は改変によって）含む。

【0070】

標的分子とその開裂不能捕獲分子の間の結合は分子の特異的親和性に、各分子のアロステリック特性に、それらのイオン環境に、分子のイオン電荷に及び標的分子とその開裂不能捕獲分子の間の可能な共有結合反応に依存することができる。好ましくは前記条件は各種の結合について文献に既に記載されているものであり、偽陽性又は偽陰性の検出を回避するために当業者によって適合されることができる。

【0071】

好ましくは前記結合を読取ることができる光学検出システムは小さな光線を検出することができる光ダイオードであってディスクの半径をカバーするために一次元軸に沿って動く光ダイオードを含むことができる（図4参照）。ディスクの回転と組合わせられると、かかる焦点合わせされた光検出装置はディスクの全表面を走査し、ディスク上のいかなる位置に存在する標的分子をもアッセイする。好ましい検出装置は音楽、ビデオ又はソフトウェアCD用に用いられる商業的に利用可能なCD読取り器の光ダイオードである（図5参照）。

【0072】

光システムはそれを検出表面に焦点合わせされた状態に留めるためにサーボ制御されることができる。もし第二の光学検出システムが信号の検出のために与えられるのなら、それもサーボ制御されることができるか又はその制御のために他のシステムに連結されることができる。又はそれはディスクへのその焦点及びそのトラックを調整するために第一のシステムからデータを受取ることもできる。ディスク表面の連続的読取りから受取られたデータはコンピュータに記憶され、必要ならば再編成され、スポット位置を規定するために分析されることもできる。

【0073】

標的分子とその開裂不能捕獲分子の間の結合が光度信号を形成させると光度信号が得られる。有利には前記結合（標的分子のその開裂不能捕獲分子への結合）の検出及び／又は定量はレーザー光線の反射の変化を用いたCD 2進数検出システムの原理に基づいている。レーザー反射の振動はレーザー光線が溝中のピットを検出する場合に得られる。

【0074】

本発明の第一の実施態様によれば、前記ピットは標的分子と開裂不能捕獲分子の間の結合の結果生ずる沈殿であることが有利である。

【0075】

他の好ましい実施態様によれば、レーザー反射の振動はコンパクトディスクの一つの又はいくつかの層への腐蝕性攻撃によっても得ることができる。例えば、標的分子とその開裂不能捕獲分子の間の結合は層の限定された改変を引き起こすことができ、それは前記層中にくぼみを形成するであろう（図3参照）。層中のかかるくぼみは「マウンド（mounds）」又は「こぶ（bumps）」と通常呼ばれるが、負のピットとしても認められる（文献 Recordable CD Guide, Lee Purcell & David Martin, Sybex 編を参照）。これらの振動はレーザー光線によってランドとは異なるピットとして検出される。標的分子とその開裂不能捕獲分子の間の結合は前記結合が生ずる場合にのみ得られる光放出によっても直接検出及び定量することができる。

【0076】

本発明の他の好ましい実施態様によれば、標的分子とその開裂不能捕獲分子の間の結合は一つ以上の分子の固定を可能にする。前記一つ以上の分子は化学的、生物学的、蛍光的及び／又は電気的ルミネセンス光システムを通して光放出を生成するか又は磁場及び／又は電場を生成し、これらは特別の読取り装置7によって検出することができる（図1及び4参照）。

【0077】

これらのシステムは光放出及び検出を可能にするか又は改良する特殊な酵素（

ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ピルビン酸キナーゼ等)の使用に基づくことができる。

【0078】

ラベルされた標的分子6又は標的分子が捕獲された後に第二のラベルされた反応性分子を用いることができる。このラベルされた分子はビオチン1又はハプテンでラベルされたプローブを用いるサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイにおける、及び同様のラベルされた反応性分子を用いた抗体/抗原サンドイッチ結合における核酸2の如き結合対の第一部分であることができる。洗浄ステップの後、ビオチン又はハプテンは酵素とコンジュゲートしたストレプトアビジン又は抗体と反応することができ、それらは結合対の第二部分としてみなされる。ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ピルビン酸キナーゼ又は他のデヒドロゲナーゼの如き酵素を用いることができる。

【0079】

不溶性生成物を得るために前記酵素に対する特異的な基質が選択される。例えばDABはペルオキシダーゼの存在下で酸化されて不溶性生成物を形成することができる。この生成物は開裂不能捕獲分子上に沈殿し、かかる沈殿はディスク表面にこぶ又はマウンドを形成し、ディスク表面は(レーザー)光線によって照射される。反射された(レーザー)光線の強度は沈殿を照射する場合は低下し、(レーザー)反射の摂動が得られる。かかる摂動はディスク表面上のビットとして感光性検出装置によって分析される。

【0080】

ディスクの透明部分を通る光透過によって検出されるのならば、沈殿の存在は吸光度を示し、これを測定することができる。

【0081】

別の不溶性生成物はコロイド金属金が用いられる場合、例えばストレプトアビジン3への結合の場合に得られる。コロイド金は銀(Ag)4の還元を触媒し、結合が得られる場合にAg沈殿を生成させる。銀付着はディスク5上に通常存在する金又はアルミニウム層と比較して(レーザー)光線反射を減少させ、他の金属が存在していない場合は光のいくらかを反射することができる。光に対して不

透明なこの沈殿はディスクを通した透過アッセイにおける光吸収によっても検出することができる（図2及び6参照）。

【0082】

標的分子に付着した第一結合対の認識を可能にする結合分子を担持するマイクロビーズ（第二結合対）を用いることも可能である。これらのマイクロビーズは標的分子とその開裂不能捕獲分子の結合が得られたディスク表面上に配置される。これらのビーズは（レーザー）光線を回折させて（レーザー）反射の振動を生成させる。（レーザー）反射のこれらの振動は感光性検出装置によって検出されてディスク表面上のビットとして分析される。

【0083】

本発明の他の実施態様によれば、検出は標的分子の（蛍光分子での）ラベリングによって得られる。（レーザー）光線はコンパクトディスク表面を走査し、記録された蛍光を分析する。フルオレセイン、フィコエリトリン、ローダミン又はランタナイドキレートの如き多くの蛍光分子が標的分子に関連して利用可能である。これらは標的分子の直接又は間接ラベリングのために核酸、抗体、又はマイクロビーズ上に容易にラベルすることができる。

【0084】

記録された信号は2進信号として又は絶対値として読取ることができる。2進信号は電子情報化されたデータとして迅速に処理され、好適なソフトウェアによって分析させることが有利である。このソフトウェアは得られた検出を分析して標的分子とその開裂不能捕獲分子の間の結合を定量することができるデータへとこの情報を変換する。

【0085】

好ましくは、本発明によるディスクは付加的なビットを好ましくは開裂不能捕獲分子に隣接する溝中に含むことができる。これは前記隣接する開裂不能捕獲分子の型、量、及び特異性に関する情報を与える。

【0086】

本発明の特別な実施態様によれば、本発明によるディスクは同一固体支持体（本発明によるディスク表面）上での核酸配列の検出、増幅及び所望により定量を

可能にするために固定されたオリゴヌクレオチド捕獲プローブを担持する。実施の他の形態においてはディスクは固定されたPCRプライマーを含む。これは増幅生成物を生成させてディスクの外部表面上に増幅生成物を固定させ、後ほど検出するためである (Rasmussen等, 1991, Anal. Biochem. 198: 138-205に記載の方法による)。

【0087】

本発明によるディスクは診断キットにおいて、所望により化学的又は生物学的化合物の前処理 (ヌクレオチド配列の遺伝子増幅の如き) によって化学的又は生物学的化合物のサンプル調製を自動的に行う診断及び読取り装置において用いられる。

【0088】

好ましくは前記装置は、サンプル中の核酸配列の精製ステップ、それらの所望による増幅ステップ (既知の遺伝子増幅方法による)、それらの診断及び所望によるそれらの定量ステップを行う自動核酸診断システムの如き一体化されたシステム中で多数のステップ又はサブステップを組合わせるシステムである。

【0089】

本発明の好ましい実施態様は以下の非限定的実施例において説明されるであろう。

【0090】

【実施例】

実施例1: CD上のDNAの検出

この実験の目的はCD支持体に結合した捕獲プローブ上の直接ハイブリダイゼーションによって特異的DNAを検出することであった。検出は比色測定によって実行された。捕獲プローブはアミノ化されたポリカーボネートCDに結合され、次に相補的ビオチン化DNAを用いてハイブリダイゼーションが行われ、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを用いて陽性ハイブリダイゼーションが検出された。

【0091】

1. CDのポリカーボネートのアミノ化

CDは室温でNaOHの1N溶液中で30分間インキュベートすることによってまずカルボキシ化された。水で3回洗浄した後、カルボキシ化されたCDは1mg/mlの水溶性カルボジイミドと1mMのN-メチルプロパン1-3ジアミンを含むMES 0.1M pH6緩衝液溶液中で室温で2時間インキュベートされた。MES 0.1M pH6緩衝液で3回、水で3回洗浄した後、アミノ化されたCDは37℃で30分間乾燥された。

【0092】

2. アミノ化されたCDへの捕獲プローブの固定

CMV捕獲プローブを含む溶液と、HIV捕獲プローブを含む溶液の二つの溶液が調製された。これらの溶液は変性されたDNA捕獲プローブ（CMV又はHIV）を2μg/mlの濃度で、カルボジイミドを1.6mg/mlの濃度で含むMeIM 0.01M pH7.5緩衝液であった。

【0093】

3×20μlのこれらの溶液は二つのアミノ化されたCD上にスポット状に適用され、これらのCDは湿潤雰囲気中で50℃で5時間インキュベートされた。NaOH 0.4N+Tween 0.25%で50℃で5分間3回洗浄した後、これらのCDは水で3回洗浄され、37℃で30分間乾燥された。

【0094】

3. CDへのCMVビオチン化されたDNAのハイブリダイゼーション

両方のCDは捕獲プローブを変性させるためにNaOH 0.2N中で5分間インキュベートされ、次に0.15MのNaClを含む0.1Mマレイン酸緩衝液pH7.5で洗浄された。次にこれらのCDは変性されたDNA鋸精液100μg/ml、SSC 4X、Denhardt 5X及び変性されたCMVビオチン化DNAを70ng/mlの濃度で含むハイブリダイゼーション溶液中で65℃で2時間インキュベートされた。ハイブリダイゼーションステップの後、CDは15mMのNaClとTween 0.3%を含む0.01Mマレイン酸緩衝液で室温で3回洗浄された。

【0095】

第一のCDは次に0.15M NaCl、0.1%牛乳粉末及びストレプトア

ビジン-ペルオキシダーゼ $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 0.1M マレイン酸緩衝液で室温で45分間インキュベートされた。コンジュゲートのインキュベート後、両方のCDは 1.5mM の NaCl と Tween 0.3% を含む 0.01M マレイン酸緩衝液で室温で3回洗浄された。

【0096】

4. ハイブリダイズしたDNAの検出

第一のCDは次にTMB溶液 (Medgenix) 中で10分間インキュベートされた。陽性ハイブリダイゼーションが生じた場所を表す青色を確認するためにこのインキュベーションの1分後にこのCDの写真が撮られた (図4)。結果はCDを通る透過光の吸収によって得ることができる。

【0097】

実施例2: マスター検出を用いたCD上のDNAの検出

DNA捕獲プローブはCD表面上にスポット状に適用され、標的DNAを用いたハイブリダイゼーションは実施例1と同様であった。ビオチン化されたハイブリダイズしたDNAの検出のため、CDは 0.15M の NaCl 、 0.1% 牛乳粉末及びストレプトアビジン-コロイド金 (Sigma, St-Louis, USA) $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 0.1M マレイン酸緩衝液で室温で45分間インキュベートされた。陽性のハイブリダイゼーションが生じた場所に銀沈殿を生成させるために、CDは銀増強キット (Sigma, St-Louis, USA) からの溶液A及びBを等容量合わせることで調製した溶液中で30分間更にインキュベートされた。このCDは金層で回復され、レーザーCDプレーヤーによってCD上に書き込まれた情報及び銀沈殿による干渉を読取られた (図2及び3)。

【0098】

実施例3: 光吸収によるCD上のタンパク質の検出

用いられたCDはピットにデータを部分的に刻印され、この部分は金で被覆された。捕獲分子はCDの縁でプラスチック表面上に直接固定された。

【0099】

1. CDのカルボキシ化

第一のCDは NaOH 1N 中で室温で30分間インキュベートされ、次に水

で3回洗浄され、37℃で3.0分間乾燥された。

【0100】

2. CD上への抗体の固定

三つの異なる種類の抗体がカルボキシ化されたCD上に固定された：ウシ血清アルブミンに対する抗体、フルオレセインに対する抗体（陰性コントロールとして）、及びストレプトアビジンに対する抗体（陽性コントロールとして）。

【0101】

カルボジイミド (Acros) を 1 mg/ml で及び三つの異なる抗体の一種類を $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ で含む硼酸緩衝液 $0.02\text{ M NaCl pH}8$ 。2の三つの異なる溶液 $20\text{ }\mu\text{l}$ は三つの異なるCD部分にスポット状に適用された。これらのスポットは4℃で一晩インキュベートされ、次にカゼインを 0.1% 含むグリシン緩衝液 $0.1\text{ M pH}9$ 。2で10分間洗浄され、次にTween 20を 0.1% 含むグリシン緩衝液 $0.1\text{ M pH}9$ 。2で5分間、2回洗浄され、最後にグリシン緩衝液 $0.1\text{ M pH}9$ 。2で2回洗浄された。CDは37℃で3.0分間乾燥された。

【0102】

3. CD上でのELISA技術によるウシ血清アルブミンの検出

CDは 0.1% のカゼインを含むPBS中の $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ の血清アルブミン溶液と共に、表面上に固定された三つの異なる抗体で室温でインキュベートされた。インキュベーションは90分間行われた。CDは 0.1% のTween 20を含むPBSで3回洗浄され、次に 0.1% のカゼイン及び $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ の血清アルブミンに対するビオチン化された抗体を含むPBSと共に45分間インキュベートされた。CDは次に 0.1% のTween 20を含むPBSで3回洗浄され、次に 0.1% のカゼイン及びストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ で含むPBS溶液中で45分間インキュベートされた。CDは 0.1% のTween 20を含むPBSで3回洗浄された。検出のため、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼが固定されたCDはTMBの溶液中でインキュベートされ、BSAに対する及びストレプトアビジンに対する抗体がスポット状に適用された部分を表す青色を確認するためにカメラの下で2分後、4分後及び6分後に写真が撮ら

れた。

【0103】

実施例4：レーザー検出を用いたCD上のタンパク質の検出

アルブミンはCD表面上にスポット状に適用され、抗体との反応は実施例3と同様であった。ビオチン化された抗体に対して反応させるために用いたコンジュゲートはストレプトアビジン-金であった。それは $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で0.1%カゼインを含むPBS溶液中で45分間インキュベートされた。ストレプトアビジン-金は銀還元のための中心として働く。「銀増強剤」(Sigma)の溶液が15分間室温で用いられた。銀沈殿はBSAに対する及びストレプトアビジンに対する抗体がスポット状に適用された場所で観察された。沈殿及び沈殿の大きさ(直径約 $1\mu\text{m}$)による光吸収の変動が観察された。ピットの存在はレーザー光線の反射によって見出された(図5)。

【0104】

実施例5：CD上のDNA又はタンパク質の磁性検出

CD支持体上にハイブリダイズしたDNA又はタンパク質の検出は磁性方法によって達成された。DNA又は抗体に結合したビオチンは鉄流体(ferro-fluid)(Immunicon, Huntington Valley, PA, USA)へコンジュゲートしたストレプトアビジンによって認識されることができる。このコンジュゲートは鉄流体の鉄核の大きさに応じて磁性又は常磁性であり、磁場中で検出することができる(図7)。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明による検出ステップの一例である。

【図2】

本発明による信号形成ステップの一実施態様を示す。

【図3】

本発明による検出ステップの一実施態様を示す。

【図4】

本発明による検出ステップの一実施態様を示す。

【図5】

本発明による検出ステップの一実施態様を示す。

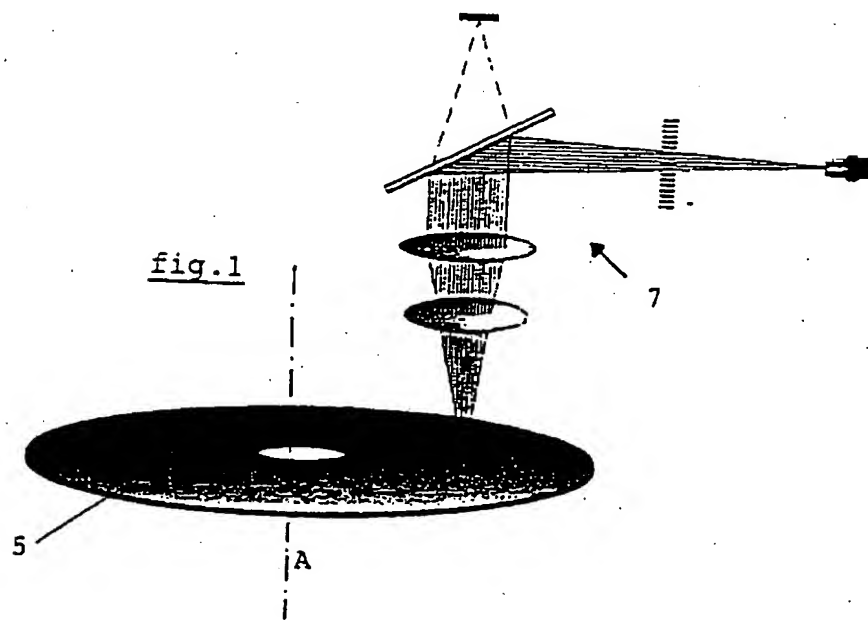
【図6】

ディスク上に形成された銀沈殿を示す。

【図7】

本発明による検出ステップの一実施態様を示す。

【図1】



【図2】

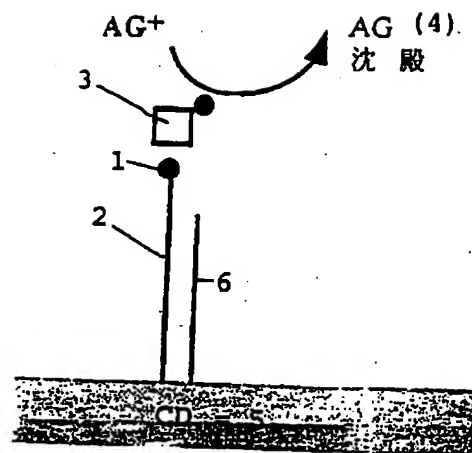


FIG.2

【図3】

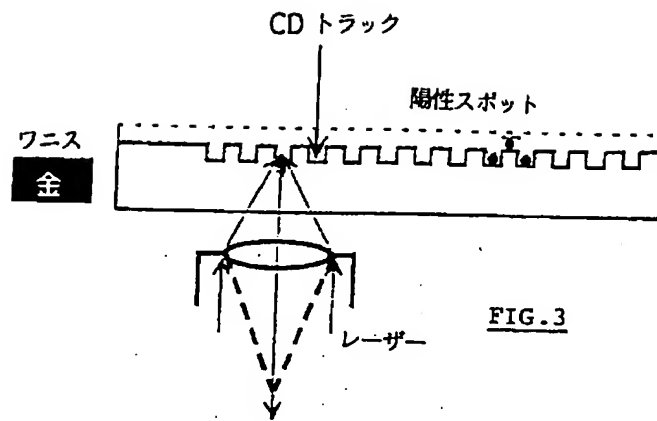


FIG.3

【図4】

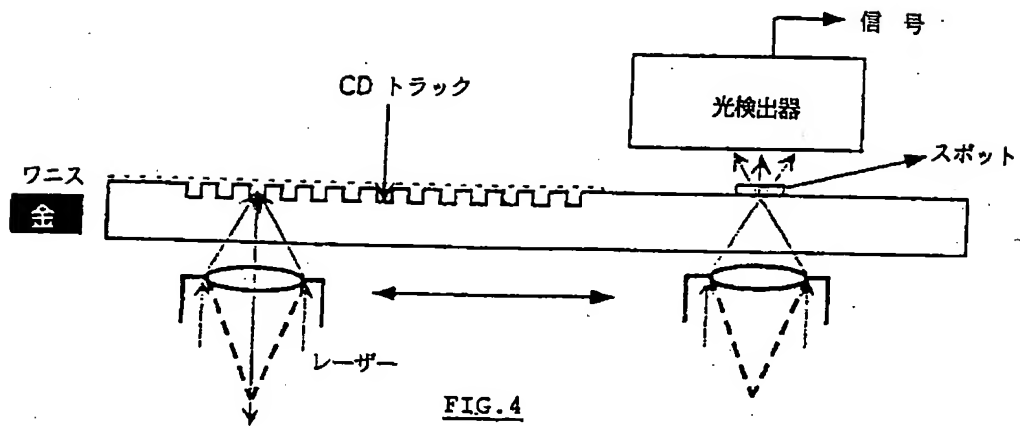


FIG.4

【図5】

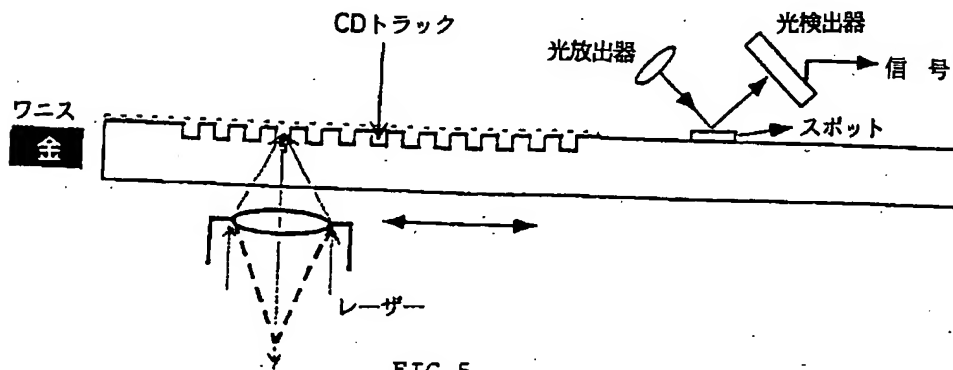


FIG.5

【図6】

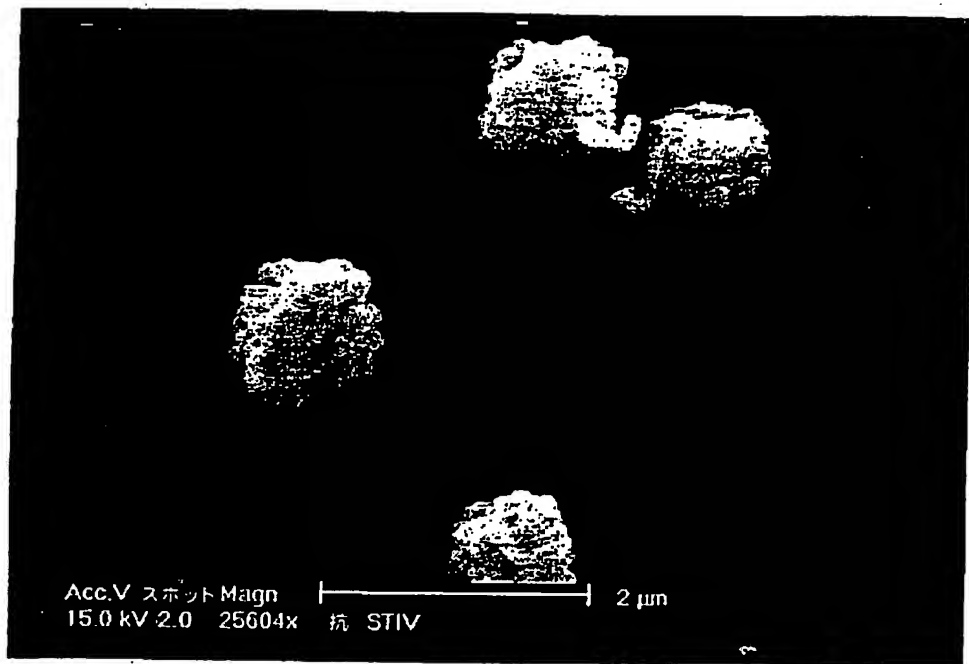


FIG.6

【図7】

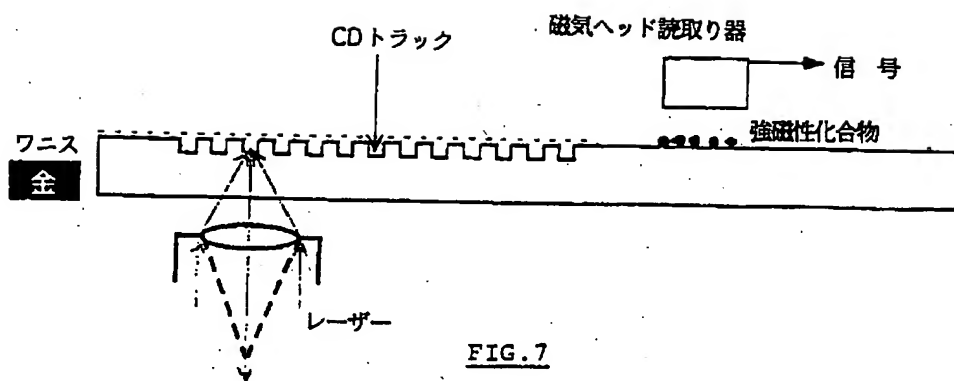


FIG.7

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年2月4日(2000. 2. 4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下のステップを含む、サンプル、好ましくは生物学的サンプル中に存在する標的分子の検出及び／又は定量方法：

－ 記録データを含むディスクである固体支持体の表面の一つの側上に固定された捕獲分子と前記標的分子の間の結合を行わせ、前記結合によって信号を生ぜしめ（ただし、前記記録データは標的分子と捕獲分子の結合から生ずる信号の読取りに供される領域から離れた領域上に位置されている）、

－ 前記信号が捕獲分子の開裂を通して得られないという条件で前記信号を検出及び／又は定量し、そして

－ 記録情報を読取り、及び標的分子と捕獲分子の間の結合から生ずる信号を読取る（ただし前記読取りは二つの異なる読取り装置によって行われる）。

【請求項2】 捕獲分子及び標的分子がヌクレオチド配列であることを特徴とする請求項1の方法。

【請求項3】 捕獲分子及び標的分子がそれぞれ抗原又は抗体であることを特徴とする請求項1の方法。

【請求項4】 捕獲分子及び標的分子がそれぞれレセプター又は前記レセプターのリガンドであることを特徴とする請求項1の方法。

【請求項5】 信号の検出及び／又は定量が光線、好ましくはレーザー光線の反射、吸収又は回折、又は電磁場の変化によって得られることを特徴とする請求項1-4のいずれか一項の方法。

【請求項6】 信号の検出及び／又は定量が光線による結合した標的分子及び捕獲分子の励起後の蛍光放出によって得られることを特徴とする請求項1-5

のいずれか一項の方法。

【請求項 7】 信号の検出及び／又は定量が標的分子とその捕獲分子の間の結合の結果である光線、放射線又は磁場の直接放出によって得られることを特徴とする請求項 1－4 のいずれか一項の方法。

【請求項 8】 光線の放出が化学的、生物学的、蛍光的及び／又は電気的ルミネセンス光又は放射線を放射する能力を持つ分子からなる群から選択される結合分子によって生成されることを特徴とする請求項 6 又は 7 の方法。

【請求項 9】 標的分子と捕獲分子の間の結合が沈殿、好ましくはコロイド金属試薬の付着物の如き不透明の又は磁性沈殿、好ましくは銀沈殿をディスクの表面上に生成させ、及び／又はディスクの表面の一以上の層の腐蝕を生じさせることを特徴とする請求項 1－8 のいずれか一項の方法。

【請求項 10】 標的分子と開裂不能捕獲分子の間の結合が前記結合から生ずる信号の検出及び／又は定量において用いられる一以上の分子の固定を可能にすることを特徴とする請求項 1－9 のいずれか一項の方法。

【請求項 11】 標的分子と開裂不能捕獲分子の間の結合が前記結合から生ずる信号の検出及び／又は定量において用いられる一以上のマイクロビーズ又は磁気粒子の固定を可能にすることを特徴とする請求項 10 の方法。

【請求項 12】 ディスクがその軸 (A) 上で回転している時に信号が得られることを特徴とする請求項 1－11 のいずれか一項の方法。

【請求項 13】 ディスクの記録データが 2 進データ、好ましくは溝付 2 進データであることを特徴とする請求項 1－12 のいずれか一項の方法。

【請求項 14】 ディスクがコンパクトディスクであることを特徴とする請求項 1－13 のいずれか一項の方法。

【請求項 15】 記録データが捕獲分子と標的分子の間の結合から生ずる信号の処理及び解釈において用いられるデータであることを特徴とする請求項 1－14 のいずれか一項の方法。

【請求項 16】 ディスクが連結されて流体接触している微小流路を含むことを特徴とする請求項 1－15 のいずれか一項の方法。

【請求項 17】 記録データを含むディスクにおいて、ディスクが記録デー

タを含む領域とは異なる使用領域中でディスクの表面の一つの側上に固定された開裂不能捕獲分子であって検出及び／又は定量されるべき標的分子と結合する捕獲分子を更に含むことを特徴とするディスク。

【請求項 18】 開裂不能捕獲分子及び／又は標的分子が核酸分子、好ましくはヌクレオチド配列、抗原、抗体、レセプター、レセプターのリガンド、ペプチド性又はタンパク質性分子、脂質、糖、ハプテン、発蛍光団、発色団、触媒、組合せ化学によって得られる新規巨大分子、又はそれらの組合せからなる群から選択されることを特徴とする請求項 17 のディスク。

【請求項 19】 ディスクの記録データが 2 進データ、好ましくは溝付 2 進データであることを特徴とする請求項 17 又は 18 のディスク。

【請求項 20】 コンパクトディスクであることを特徴とする請求項 19 のディスク。

【請求項 21】 連結されて流体接触している微小流路を含むことを特徴とする請求項 17-20 のいずれか一項のディスク。

【請求項 22】 請求項 17-21 のいずれか一項のディスクの製造方法であって、開裂不能捕獲分子の光活性化を通して、記録データを含む領域とは異なる特異的な使用領域中で前記捕獲分子を予めデータが記録されているディスクの表面の一つの側上に固定するステップを含む方法。

【請求項 23】 開裂不能捕獲分子の固定が捕獲分子の端とディスクの表面層の間の共有結合を通して得られることを特徴とする請求項 22 の方法。

【請求項 24】 ディスク表面が保護層、好ましくは有機化合物製の保護層を含み、前記保護層が開裂不能捕獲分子の保護及び安定化及び／又は標的分子とその開裂不能捕獲分子の間の結合の保護、安定化及び／又は検出を可能にするか又は改善することを特徴とする請求項 22 又は 23 の方法。

【請求項 25】 請求項 17-21 のいずれか一項のディスク、及び標的分子とその捕獲分子の間の結合を行わせる反応体、及び所望により前記結合から生ずる信号を検出する反応体を含む診断キット。

【請求項 26】 サンプル中に存在する標的分子とその捕獲分子の間の結合から生ずる信号を検出及び／又は定量する検出及び／又は読取り装置であって、

請求項 17-21 のいずれか一項のディスク又は請求項 25 のキット、及び前記信号の検出及び／又は定量のための手段を含む装置。

【請求項 27】 読取りコンパクトディスク装置である請求項 26 の検出及び／又は読取り装置。

【請求項 28】 ディスク上の記録データを読取るための第一読取りヘッド、及び標的分子とその捕獲分子の間の結合から生ずる信号の検出及び／又は定量のための第二読取りヘッドを含むことを特徴とする請求項 27 の検出及び／又は読取り装置。

【請求項 29】 一体化された検出及び／又は読取り装置内での標的分子の精製、標的分子の特異的開裂、前記標的分子の所望の遺伝子増幅のための付加的な手段を含む請求項 26-28 のいずれか一項の検出及び／又は読取り装置。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】

しかし、この複雑で高価な検出方法及び装置は前記開裂可能な信号素子と様々な相互作用を生じ得るので、様々な複合体分析対象物の検出において様々な偽陽性又は偽陰性を生ずる。

文献 WO 97/21090 は固体支持体、分析する生物学的サンプルのための入口、及び前記固体支持体の内側に前記サンプルの様々な処理のための微小流路を含むディスクを記載している。ディスクの形状の前記平坦な固体支持体の他の側は前記ディスクの回転を制御するための電磁的にコードされた指令を含む。生物学的サンプルは求心力による運動によって様々な微小流路に注入することができる流体中に存在する。

文献 WO 96/09548 は光学的に透明なディスク上で生物学的、化学的又は生化学的サンプルの分析を行う装置及び方法を記載している。前記一般的な光学分析技術はサンプルが付着されているコンパクトディスクの表面を前記表面

に実質的に焦点を合わされた光線で走査することによってコンパクトディスクに適合することができる。位置コードは各位置の間に位置コードを一つ増加させることによって最内トラックの周りの別の領域に刻印することができる。コードはトラックからトラックへと増加される。代わりに、アドレス情報は同様にトラックセクター配置に従って分布させることができ、サーボコードは磁気フロッピー及びハードディスクにコードされる。前記システムにおいては上部表面に付着されたいかなる生物学的材料もディスクを励起させる光で干渉される。反射層によって反射された光はディスクにデジタル的にコードされた情報を用いて変調されるので、検出器の出力は同様に変調される。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正内容】

【0025】

ディスクは1.2mmの厚さと12cmの直径を一般的に持つが、より小さい支持体も存在し、特殊な適用（ペトリ皿への捕獲分子と標的分子の間の結合の如き）のために適合されることができ、厚さは用いられる本発明の検出方法と捕獲分子の技術的要求に応じて適合されることができる。

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年3月27日(2000. 3. 27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正内容】

【0036】

商業的なCDドライブの一つの特異的な特徴はかかるビットを読取って900 Kb/秒で送出するそれらの特性である。このことはこのレーザー反射器技術を記録されたビットの読出しのみならず結合の結果の読出しのためにも特に好適なものにする。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0043

【補正方法】変更

【補正内容】

【0043】

本発明のコンパクトディスクの製造及び操作のために最も有利な好ましい実施態様は以下の四つの既に存在する様式のうちの二以上の範囲内の寸法を有する：

- 約3.8cmの半径と約1mmの厚さを有する5cmコンパクトディスク(CD)、
- 約6cmの半径と1mmの厚さを有する12cmCD、
- 10cmの半径と2mmの厚さを有する20cmCDV(商業的には「レーザービジョン(Laservision)」ディスクと称される)、及び
- 15cmの半径と2mmの厚さを有する30cmCDVディスク。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正内容】

【0094】

3. CDへのCMVビオチン化されたDNAのハイブリダイゼーション

両方のCDは捕獲プローブを変性させるためにNaOH 0.2N中で5分間インキュベートされ、次に0.15MのNaClを含む0.1Mマレイン酸緩衝液pH7.5で洗浄された。次にこれらのCDは変性されたDNA鋳精液100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、SSC 4X、Denhardt 5X及び変性されたCMVビオチン化DNAを70ng/mlの濃度で含むハイブリダイゼーション溶液中で65℃で2時間インキュベートされた。ハイブリダイゼーションステップの後、CDは15mMのNaClとTweenTM 0.3%を含む0.01Mマレイン酸緩衝液で室温で3回洗浄された。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0096

【補正方法】変更

【補正内容】

【0096】

4. ハイブリダイズしたDNAの検出

第一のCDは次にTMB溶液 (Medgenix) 中で10分間インキュベートされた。陽性ハイブリダイゼーションが生じた場所を表す青色を確認するためにこのインキュベーションの1分後にこのCDの写真が撮られた。結果はCDを通る透過光の吸収によって得ることができる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0101

【補正方法】変更

【補正内容】

【0101】

カルボジイミド (Acros) を 1 mg/ml で及び三つの異なる抗体の一種類を $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ で含む硼酸緩衝液 $0.02\text{ M NaCl pH}8.2$ の三つの異なる溶液 $20\text{ }\mu\text{l}$ は三つの異なるCD部分にスポット状に適用された。これらのスポットは 4°C で一晩インキュベートされ、次にカゼインを 0.1% 含むグリシン緩衝液 $0.1\text{ M pH}9.2$ で 10 分間洗浄され、次に TweenTM 20 を 0.1% 含むグリシン緩衝液 $0.1\text{ M pH}9.2$ で 5 分間、 2 回洗浄され、最後にグリシン緩衝液 $0.1\text{ M pH}9.2$ で 2 回洗浄された。CDは 37°C で 30 分間乾燥された。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0102

【補正方法】変更

【補正内容】

【0102】

3. CD上でのELISA技術によるウシ血清アルブミンの検出

CDは 0.1% のカゼインを含むPBS中の $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ の血清アルブミン溶液と共に、表面上に固定された三つの異なる抗体で室温でインキュベートされた。インキュベーションは 90 分間行われた。CDは 0.1% の TweenTM 20 を含むPBSで 3 回洗浄され、次に 0.1% のカゼイン及び $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ の血清アルブミンに対するビオチン化された抗体を含むPBSと共に 45 分間インキュベートされた。CDは次に 0.1% の TweenTM 20 を含むPBSで 3 回洗浄され、次に 0.1% のカゼイン及びストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ で含むPBS溶液中で 45 分間インキュベートされた。CDは 0.1% の TweenTM 20 を含むPBSで 3 回洗浄された。検出のため、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼが固定されたCDはTMBの溶液中でインキュベートされ、BSAに対する及びストレプトアビジンに対する抗体がスポット状に適用された部分を表す青色を確認するためにカメラの下で 2 分後、 4 分後及び 6 分後に写真が撮られた。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/BE 98/00206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/543 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	EP 0 887 645 A (SUISSE ELECTRONIQUE MICROTECH ; PRIONICS AG (CH); SCHERRER INST PAU) 30 December 1998 see claims; figure 4E see column 8, line 12 - line 18 see page 11, line 51 - page 12, line 7	1-29
P,X	EP 0 886 141 A (SUISSE ELECTRONIQUE MICROTECH ; PRIONICS AG (CH)) 23 December 1998 see claims; figure 4E see column 7, line 46 - line 56 see column 15, line 34 - line 41 -/-	1-29

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May 1999

Date of mailing of the international search report

01/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5616 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3015

Authorized officer

Routledge, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PC1/BE 98/00206

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No. -
P,X	WO 98 15356 A (GORDON JOHN FRANCIS ;MOLECULAR DRIVES LIMITED (GB)) 16 April 1998 see claims see page 3, line 15 - line 16 see page 6, line 11 - line 24 see page 7, line 33 - page 8, line 15 see page 12, line 21 - page 13, line 19; figure 3 see page 18, line 16 - line 22 ---	1-29
P,X	WO 98 12559 A (DEMERS JAMES P) 26 March 1998 see claims 2,5 see page 7, paragraph 2 see page 8, paragraph 3 - page 9, paragraph 1 see page 15, paragraph 2 - page 18, paragraph 2 ---	1-29
X	WO 97 21090 A (GAMERA BIOSCIENCE) 12 June 1997 cited in the application see claims 1,14-21,30-63 see page 6, line 2 - line 7 see page 11, line 2 - line 28 see page 28, line 11 - page 29, line 14 see page 52, line 3 - page 53, line 30 ---	1-29
X	WO 96 09548 A (GORDON JOHN FRANCIS ;UNIV DUNDEE (GB)) 28 March 1996 see claims see page 4, line 14 - page 5, line 8 see page 6, line 3 - line 17 see page 11, line 5 - line 20 see page 14, line 5 - line 18 -----	1-29

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(Information on patent family members)

(International Application No)

PCT/BE 98/00206

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0887645 A	30-12-1998	EP 0886141 A	23-12-1998
EP 0886141 A	23-12-1998	EP 0887645 A	30-12-1998
WO 9815356 A	16-04-1998	AU 4564297 A	05-05-1998
WO 9812559 A	26-03-1998	AU 4428497 A	14-04-1998
WO 9721090 A	12-06-1997	AU 702403 B	18-02-1999
		AU 1283397 A	27-06-1997
		CA 2239613 A	12-06-1997
		EP 0865606 A	23-09-1998
		NO 982563 A	05-08-1998
		AU 4144897 A	06-03-1998
		WO 9807019 A	19-02-1998
WO 9609548 A	28-03-1996	AU 3481595 A	09-04-1996
		BR 9509021 A	30-12-1997
		CA 2200562 A	28-03-1996
		CN 1158659 A	03-09-1997
		EP 0782705 A	09-07-1997
		JP 10504397 T	28-04-1998
		US 5892577 A	06-04-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード (参考)
G 0 1 N 37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	A
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GD, GE, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, T R, TT, UA, US, UZ, VN, YU			
Fターム(参考) 4B024 AA11 AA19 CA01 HA14 HA15			
4B029 AA07 AA21 BB15 BB17 BB20			
CC03 CC08 FA15			
4B063 QA01 QA18 QQ10 QQ42 QR02			
QR32 QR50 QR56 QR58 QR84			
QS03 QS35 QS36 QS39 QX01			
4H045 AA30 BA62 BA63 DA75 EA50			
FA81			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.